Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Basel

Ueber die chromatographische Adsorbsionsanalyse biologischer Flüssigkeiten und des Stuhles

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Jean Brêchet

von Soyhières (Bern)

PHILOGRAPHISCHER VERLAG / BASEL 1938

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Basel

Ueber die chromatographische Adsorbsionsanalyse biologischer Flüssigkeiten und des Stuhles

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Jean Brêchet

von Soyhières (Bern)

PHILOGRAPHISCHER VERLAG / BASEL 1938

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Professor Dr. A. Gigon.

Tag der Promotion: 19. Dezember 1936.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Über die chromatographische Adsorbsionsanalyse biologischer Flüssigkeiten und des Stuhles.

Die Trennungsmethode durch chromatographische Adsorbsionsanalyse wurde im Jahre 1906 durch den Botaniker *Tswett* erfunden (1. 2. 3.). Sie besteht darin, daß man eine Lösung der zu untersuchenden Farbstoffe durch eine Säule von adsorbierenden Stoffen in feinem Pulverzustand fließen läßt. Die verschiedenen Pigmente werden so auf verschiedenen Höhen der Säule adsorbiert. Man kann sie dann trennen und für sich untersuchen.

Es bilden sich auch Farbzonen in der Capillaranalyse, welch letztere von *Schönbein* entdeckt (17) und von *Goppelsdoeder* (16) untersucht wurde. Hier werden Filtrierpapierbänder in die Farbstofflösungen eingetaucht.

Der Vorteil der Chr. Ad. *) liegt in der Möglichkeit die ganze Säule mit einem Lösungsmittel (dem Entwickler) waschen zu können und eine schärfere Trennung der Ringe zu erreichen. Die einzelnen Pigmente kann man dann mechanisch trennen und mit Hilfe eines Lösungsmittels (dem Eluens) von dem Adsorbens isolieren.

Die Chr. Ad. wurde bis zum Erscheinen der Arbeiten von *Kuhn* 1931 (5) über Carotinoide und andere pflanzliche Farbstoffe wenig gebraucht. Seitdem hat sich die Methode stark entwickelt, hauptsächlich auf dem Gebiet der Vitamine.

Sie erwies sich als sehr wertvoll für die reinliche Darstellung von gefärbten und ungefärbten Stoffen, Trennung von Isomeren und Homologen und für die Reinlichkeitskontrolle vieler Substanzen.

Wir werden uns zunächst mit den technischen Fragen der Chr. Ad. befassen und zwar werden wir, neben einer kurzen Erwähnung der bisherigen Methoden, die in dieser Arbeit angewendeten Modifikationen erklären.

Die Masse der Glascylinder, welche das Adsorbens enthalten, betragen je nach Menge und Adsorbsionsfähigkeit der zu untersu-

*) Chr. Ad. = Chromatographische Adsorbsionsanalyse.

chenden Lösung 15 bis 100 cm in der Länge, und 1 bis 30 cm im Durchmesser (4, 5, 8, 9).

Für unsere Versuche haben wir hauptsächlich Glastuben von 1 cm Durchmesser und 10 bis 15 cm Länge verwendet. Der untere Abschluß des Cylinders wurde früher immer ziemlich kompliziert gebaut (4, 8, 9). Wir haben ihn einfach durch einen Wattebausch ersetzt. Dieser wurde von oben her mit Hilfe eines dem Cylinder entsprechenden Metallstabes fest zusammengepreßt. Der auf diese Weise gepreßte Tampon muß ca. 1½ cm lang sein. Seine Reibung gegenüber der Cylinderwand ist stark genug um die ganze Säule tragen zu können, auch unter Wirkung der Wasserstrahlpumpe.

Tswett und *Dérhé* (4) haben das Asorbens in kleinen Schichten nacheinander zusammengepreßt. *Winterstein* (8) füllte den Cylinder mit einer Suspension des Adsorbens und wartete bis sich das Pulver gesetzt hatte. Das Pulver ist dann viel gleichmäßiger verteilt und die Füllung verlangt weniger Arbeit.

Wird so vorgegangen, daß wir zuerst den Cylinder bis oben locker füllten, über der Säule wurde dann der Cylinder mit einem kleinem Wattebausch abgeschlossen und jene mit Hilfe eines Kolbens zusammengepreßt. Darauf entfernte man den kleinen Wattebausch mit einem Haken. Die ganze Säule war auf diese Weise vollkommen gleichmäßig ausgefüllt, mit Ausnahme einer kleinen Schicht von ca. ½ cm am oberen Ende, die etwas dichter zusammengedrückt war. Diese Schicht kann man mit einem rechtwinwinkeligen Haken abkratzen. Die Vorteile dieses Verfahrens, das für Tuben von 1 bis 2 cm brauchbar ist, sind folgende:

1) Die Adsorbsionssäule wird sehr rasch zum Gebrauch fertiggestellt.
2) Das Adsorbens ist kompakter, so daß man beim Aufgießen einer Flüssigkeit kein Aufwirbeln zu befürchten hat.
3) Beim Austrocknen bilden sich keine Spalten.
4) Da das Pulver trocken ist dringt die Flüssigkeit wegen der Kapillarität schneller durch. Dieser Vorteil ist besonders groß, wenn es sich um physiologische Flüssigkeiten handelt, wie z. B. Serum oder Hämoglobinlösung, die an sich ziemlich viskös sind.

Die Adsorbentien: Es sind allerlei Adsorbentien gebraucht worden. Aluminium-Hydroxyd (6) Calcium-Carbonat, Calcium-Hydroxyd (10) CO_2-Schnee (11) Bleicherde (12) Talk, Zucker (8)

u. s. w. Am stärksten adsorbiert Kalk, ferner Bleicherde, aktiviert oder nicht (21). Wir werden in jedem Abschnitt das gebrauchte Adsorbens und die Begründung dafür angeben.

Als Lösungsmittel werden meistens organische Solventien verwendet. Mit Wasser (13, 15) wurden wenige Versuche gemacht. Die Elution geschieht meist mit Methanol und Äther in verschiedenen Verhältnissen gemischt, oder mit Pyridin (12); auch mit Na acetic. (14). Man hat auch eine vollständige Auflösung des Pulvers in einer Säure vorgeschlagen. Das haben wir z. B. mit Eisessig getan (S. 15). In anderen Fällen, wo dies nicht möglich ist, haben wir eine sehr gute Elution mit Na OH erzeugt, meist mit normaler Lösung.

Bis jetzt ist für die Chr. Ad. hauptsächlich der Einfluß der chemischen Constitution eingehend studiert worden (9).

Kurz zusammengefaßt darf man sagen, daß die Metalloxyde besser adsorbieren als Carbonate. — Die Kohlenwasserstoffe und Ketone werden schlechter adsorbiert als die Alkohole, und diese umso besser, je mehr Hydroxylgruppen, die Kohlenwasserstoffe umso besser, je mehr Doppelbildungen sie enthalten. Diese Regel läßt sogar Rückschlüsse auf die chemische Konstitution der Körper ziehen. — Es sei auch erwähnt, daß die sauren Körper an basischen Adsorbentien besser haften, und umgekehrt. Viele andere Faktoren sind für die Kapillaranalyse schon untersucht worden. Da aber als Adsorbens fast nur Filtrierpapier zur Verfügung steht, und weil mit dieser Methode nicht nachgewaschen werden kann, haben wir einige dieser Fragen für die Chr. Ad. studiert. Wir untersuchten unsere Adsorbentien mit dem Universalindikator BDH London und haben dabei folgendes festgestell:

Bleicherde	(rot)	entspricht	einem	p. H.	von	4,5
Bolus alba	(rot-gelb)	„	„	„	„	5.5
Ca CO_3	(gelb)	„	„	„	„	6
Al $(OH)_3$	(grün (blau)	„	„	„	„	8
Ca $(OH)_2$	(blau)	„	„	„	„	9

Es ist dann klar, daß negativ geladene Teilchen auf Ca $(OH)_2$ besser adsorbiert werden als auf Bleicherde und umgekehrt; dies abgesehen von dem besonderen Adsorbtionsvermögen jedes Körpers an sich (S. 3). Den Einfluß der verschiedenen Adsorbentien kann man mit folgendem Versuch demonstrieren: eine Alkohollösung von Methylrot und Methylenblau gibt auf Bleicherde eine

schmale rote Zone ganz oben, und eine breite blaue Zone unten. Auf Talk wird der rote Farbstoff gelb und man erhält eine breitere gelbe obere Zone und eine breite blaue untere. Auf Aluminium-Hydroxyd sind die beiden Zonen (gelbe und blaue) gleich breit und auf Ca $(OH)_2$ bildet sich eine schmälere blaue Zone oben und eine breite gelbe Zone unten.

Es ist weiter interessant, den Einfluß der Elektrolyten auf die Chr. Ad. zu untersuchen. *Boutarik* hat diesen Einfluß für die Kapillaranalyse von Hydrosolen studiert (18); *Barrenschen* und *Prinz* (20) zeigten, daß der PH einer Lösung eine große Rolle für die Adsorbtion auf Bleicherde spielt, indem bei schwach alkalischer Reaktion die Adsorbtion um 50% größer ist als in schwach saurem oder stark alkalischem Milieu. Wir haben diese Tatsache benutzt, indem wir Na OH als Elutionsmittel verwendeten. Den Einfluß der Zeit auf das Fortschreiten einer Flüssigkeit auf der Adsorbtionssäule haben wir mit Serum auf Ca $(OH)_2$ untersucht. Siehe Fig. 1. Es bilden sich dabei zwei Zonen, OA und AB. Siehe Fig. 1. Die Schicht OA entspricht dem Serum und im allgemeinen den kolloidal gelösten Stoffen.

Die zweite Schicht OA + AB = OB entspricht dem Lösungsmittel (hier Wasser) und den sich darin in echtem Lösungszustand befindenden Körpern. Wir haben auf der graphischen Darstellung No 1 die Abstände OA und OB in cm als Funktion der Zeit in Minuten eingetragen. Die Versuche wurden mit Serum und dann nach Verdünnen desselben mit 1, resp. 3 Volumina Wasser angestellt, so daß wir drei Kurvenpaare erhielten. (a und b — a' und b' — a" und b").

Man sieht dabei, daß die Adsorbtionsschicht OA der Kolloide mit der Zeit zunimmt, bis zu einem gewissen Grad, wo sie praktisch konstant bleibt. Die wäßrige Schicht schreitet dagegen viel gleichmäßiger fort. Die Formel, die diesen Kurven am besten entspricht, ist diejenige, die *Boutaric* schon für die Kapillaranalyse aufgestellt hat.

$$Y = at^n$$

y = OA, resp. OB. t — Zeit, a und n sind Konstanten.

Man bemerkt hierbei auch den Einfluß des Verdünnungsgrades der Lösungen, und wir haben in einer zweiten graphischen Darstellung die Abstände OA und OB als Funktion der Konzentration

dargestellt. Die Kurven α und β aus der Tabelle II. wurden nach einer Minute abgelesen, die Kurven α' und β' nach 2 Minuten.

In unserem Fall nimmt die Länge der Adsorbtionsschicht für Serum (OA, OA' u. s. w.) bis zu einer Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser zu. Wenn es weiter verdünnt wird, nimmt die Länge der Adsorbtionsschicht wieder ab. Dagegen schreitet das Lösungsmittel (hier Wasser) mit zunehmender Verdünnung immer schneller fort.

Es wurde oft erwähnt, daß eine Verminderung der Oberflächenspannung einen bedeutenden Einfluß auf Adsorptionsvorgänge hat (19). Das spielt aber für die Kapillaranalyse keine Rolle, und wir konnten auch beobachten, daß zwei Flüssigkeiten — von denen eine durch Zusatz von Amylalkohol eine Oberflächenspannungs-Verminderung von 25 Dyn bekam — keinen Unterschied in Bezug auf die Chr. Ad. aufwiesen.

Der Einfluß der Temperatur auf die Chr. Ad. ist unbedeutend.

Die Geschwindigkeit des Fortschreitens der Flüssigkeit steht im umgekehrten Verhältnis zu der Viskosität.

Adsorbsionsanalyse und Blutfarbstoffe.

Es ist bekannt, daß es verschiedene Hämoglobine gibt, (23 und 24) und zwar durch Unterschiede der Globin-Komponente (26). Versuche mit Natronlauge, Cyan, CO, $(NH_4)_2S$, H_2O_2 haben zu der Feststellung geführt, daß es für den Menschen wenigstens 4 OHb *) -arten gibt: das normale Menschen-OHb, dasjenige des Neugeborenen, ein Muskel-OHb und eine gegen NaOH widerstandsfähigere, im Blut des Menschen in kleinen Mengen vorkommende OHb (24). Es war also naheliegend, OHb mit der Chr. Ad. zu untersuchen. Das Blut wurde mit Liquoid flüssig erhalten, 3—4 Mal zentrifugiert, mit Saponin hämolysiert und mit Aq. dest. verdünnt. die Konzentration betrug nach *Sahli* ca. 35% OHb. Auf trockener Bleicherde dringt die Flüssigkeit, im Sinne unserer Untersuchungen von S. 6, vor. Man erhält auf diese Weise eine homogene rote Zone von ca. 2—3 cm Höhe. Nachwaschen mit Wasser bewirkte eine Verbreiterung des Ringes, sowie eine geringe Verschiebung nach unten; und nach einiger Zeit ein Umschlagen der roten Farbe in eine graue, jedoch keine Trennung. Bei ähnlichen Versuchen mit Talk, $CaCO_3$, $Al(OH)_3$ ergab sich nichts Besonderes.

*) OHb = Oxyhämoglobin.

Wohl aber mit Calcium-Hydroxyd. Diese ziemlich starke Base wirkte wie Natronlauge auf den OHb, so daß die rote Flüssigkeit in kurzer Zeit ein grau-braunes Adsorbtionsband erzeugte. Als wir einen ähnlichen Versuch mit Ochsenblut anstellten, welches gegen Lauge bekanntlich resistenter ist als Menschenblut (25), fanden wir ein rosa-rotes Band, das je nach der Konzentration erst nach einigen Stunden, resp. Tagen grau-braun wurde.

Wir merkten weiter, daß bei gleicher Konzentration und unter gleichen anderen Bedingungen das Ochsenblut auf der Säule schneller vorschreitet als das Menschenblut. Beim Waschen mit Wasser sahen wir dieselben Veränderungen wie bei den anderen Adsorbentien.

Wir haben nun ein Gemisch von Menschen- und Ochsenblut chromatographiert. Diesmal bildeten sich zwei deutliche Ringe: Der obere, grau-braune entsprach dem Menschenblut und der untere, rosa-rote, dem Ochsenblut.

Die beiliegende Photographie (siehe Anhang am Schluß) zeigt 3 Zylinder, A, B, C. A enthält Ochsenblut, C enthält Menschenblut und B enthält ein Gemisch von beiden zu gleichen Teilen. Die Konzentration war in allen Zylindern dieselbe. Das Menschenblut bildet eine schmälere braune Zone, das Ochsenblut eine breitere rote, und in dem mittleren Zylinder sind oben ein brauner und unten ein roter Ring entstanden.

Um zu untersuchen, ob dieser Adsorbtionsunterschied durch die OHb selbst oder bloß durch die Denaturierung des Menschenblutes mit dem Kalk bedingt ist, ließen wir 3 Tage lang eine gesättigte Kalklösung auf Ochsenblut einwirken. Nach dieser Zeit verhielt sich das Ochsenblut auf der Kalksäure genau wie Menschenblut, sodaß ein Gemisch von frischem und denaturiertem Ochsenblut ein gleiches Bild wie das des mittleren Zylinders ergab.

Der ganze Vorgang ist dann so zu erklären, daß das Menschenblut in Kontakt mit dem Kalk denaturiert und dann stark adsorbiert wird, und daß das Ochsenblut nicht im selben Moment angegriffen wird. Das so verschonte OHb des Ochsen wird weniger stark adsorbiert. Der rote Ring schreitet dann schneller vor. Ähnliches erfolgte auf nassem Kalk, aber viel langsamer. Auf Talk und Calcium Carbonat und Bleicherde bekamen wir keinen Unterschied zwischen Ochsen- und Menschenblut.

Wenn man ein Blutchromatogramm auf Bleicherde mit Natronlauge wäscht, geschieht folgendes: Die Lauge wirkt zuerst im Sinne einer Denaturierung der OHb und verursacht bis zu einer gewissen Konzentration eine Umwandlung der roten Zone in eine graue. Es wirkt aber auch im Sinne einer Elution, d. h. der Farbstoff wird von dem Adsorbens ziemlich scharf getrennt, sodaß er sich in einem deutlicheren und schmäleren Ring ansammelt. Dasselbe bekommt man auch mit Aluminium- Hydroxyd, nicht aber mit Kalk und Talk. Zur Bildung eines schmalen Ringes genügt schon je nach Intensität der Blutadsorbsion eine Laugen-Konzentration von n : 12 bis n : 20. Was die Denaturierung des Farbstoffes betrifft, können wir sagen, daß sie von der Konzentration der Natronlauge abhängt, aber dazu auch von dem Zeitintervall zwischen Chromatographie und Waschung.

Wir haben weiter versucht, Blut und Natronlauge zu mischen und erst nachher zu chromatographieren. Dabei erkennt man wieder die zwei Wirkungen der Natronlauge. Ihre eluierende Wirkung verursacht die Bildung eines dunkleren, schärferen Ringes am unteren Rande des Chromatogramms. Drei Faktoren beeinflussen die Denaturierung des OHb.

1) die OHB-Konzentration, 2) die Natronlauge-Konzentration, 3) die Wirkungsdauer der Natronlauge auf dem OHb vor der Chromatographie.

Man kann auf diese Weise bei geringer OHb und höherer Natronlauge-Konzentration sowie längerer Wirkungsdauer einen deutlichen braunen Ring erzeugen; bei umgekehrten Verhältnissen einen roten Ring und unter mittleren Bedingungen einen roten, scharfen unteren und einen oberen braunen, weniger scharfen Ring. Es zeigt sich also für denaturiertes OHb eine bessere Adsorbabilität als für normales.

Nach dem Unterschied zwischen Menschen- und Tierblut haben wir ähnliche Versuche mit vergiftetem Blut angestellt. Das mit Cyan vergiftete Blut ergab keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem normalen Blut, wohl aber das COHb *). Wir haben deshalb in dieser Richtung weiter gesucht; unsere Lösungen waren ca. 35% nach *Sahli.*

Auf Kalk erzeugt normales Blut eine graubraune Zone und COHb eine braunrote, welche von jener deutlich verschieden ist.

*) COHb = Kohlenoxyd-Hämoglobin.

Trotzdem aber ist sie lange nicht so schön rosa-rot wie diejenige des Ochsenblutes.

Die Chromatographie ergab auch einen deutlichen Unterschied zwischen normalem und einem Gemisch von normalem und vergiftetem Blut zu gleichen Teilen. Bei ansteigendem COHb-Gehalt erhielten wir noch eine Differenz bei einem Gemisch bis zu 25 Teilen COHb und 75 Teilen OHb. Da diese Methode aber keine größere Empfindlichkeit versprach, versuchten wir ein Gemisch von Blut und Natronlauge auf Bleicherde zu chromatographieren. Bei diesem Verfahren ist es aber schwer, die richtige Blut- und Natronlaugekonzentration herauszufinden, wie auch die Dauer der Einwirkung der Natronlauge auf Blut vor der Chr. Ad. Denn es kann, wie oben schon erwähnt, reines normales Blut unter gewissen Bedingungen einen roten unteren und einen graubraunen oberen Ring erzeugen. Man muß also bei jeder bestimmten OHB-Konzentration eine entsprechende Konzentration und Wirkungsdauer der Natronlauge herausfinden. Es ist uns gelungen, 2 Serien von je 5 Chromatogrammen zu erzeugen, welche ungefähr auf der Fig. 2 abgebildet sind.

Da die OHb-Konzentration in jeder Versuchsreihe etwas verschieden war, haben wir andere Natronlauge-Konzentrationen und auch andere Wirkungszeiten heraussuchen müssen.

Das erste Mal betrug die Wirkungszeit der Natronlauge auf das Blut vor der Chromatographie 3 Minuten, das zweite Mal einige Stunden.

Diese von uns geprüfte Methode bietet schon eine gewisse Empfindlichkeit, ist aber sehr umständlich.

Wir haben weiter noch folgendes Verfahren ausprobiert. Das zu untersuchende Blut wurde mit normalem Blut von genau gleicher Konzentration verglichen. Einige Paare von Chromatogrammen sind nach dem Verfahren mit Natronlauge auf Bleicherde erstellt worden. Die Blutkonzentration betrug ca. 35% nach *Sahli* und die Natronlauge-Konzentration war n : 10. Die Wirkung war ungefähr 1—5 Minuten. Wenn beide Blutproben frei von COHb sind, bekommt man zwei gleiche Chromatogramme. Wo dies nicht der Fall war, wurde als maßgebend die Probe betrachtet, bei der das normale Blut einen einzigen graubraunen Ring und das zu untersuchende einen roten und einen graubraunen ergab. Der Vorteil dieser Modifikation liegt darin, daß die Blutprobe keine ge-

naue Konzentration aufzuweisen braucht, ebensowenig diejenige der Natronlauge. Nur die Konzentration des normalen Blutes muß mit der des vergifteten übereinstimmen, was durch Verdünnen einer konzentrierten Lösung leicht zu erhalten ist. Der Nachteil liegt darin, daß man nicht sofort die genaue Wirkungszeit erkennt, sondern meist erst nach 2—5 Vorversuchen. Sie beträgt 1—5 Minuten. Wir haben COHb bis zu einer Konzentration von 20 bis 25% nachweisen können.

Schließlich stellten wir Versuche mit Pulvergemischen an und zwar mit Kalk einerseits und mit Calcium-Carbonat oder Talk, oder Aluminium-Hydroxyd andererseits; entweder zu gleichen Teilen oder mit $^1/_3$, $^1/_4$, $^1/_6$ Kalk. Die Ergebnisse waren annähernd gleich wie oben. COHb ergab eine rosarote Zone, OHb eine graue und das Gemisch eine grau-rote Zone bis zu einer Konzentration von 25% COHb.

Eine Kombination der Chr. Ad. mit den Methoden mit Tannin oder Ammoniumsulfid ergab nichts.

Beim Nachwaschen eines Blut-Chromatogramms (OHb sowie COHb) bildet sich ein blau-grüner Farbstoff, der im Kontakt mit der Luft erblaßt, und den wir wegen Elutionsschwierigkeiten nicht untersuchen konnten.

Adsorbsionsanalyse und biologische Flüssigkeiten.

Nach dem Hämoglobin haben wir verschiedene biologische Flüssigkeiten untersucht. Trotzdem wir dabei wenig Positives erhielten, möchten wir doch hier das Wesentlichste unserer Untersuchungen erwähnen.

Wir haben zuerst enteiweißtes Serum im Hinblick auf den Mineralstoffwechsel untersucht. Mit dem Universalindicator BDH London haben wir den pH der verschiedenen Zonen des Chromatogramms ausprobiert. Von PH-Schwankungen zwischen Wasser-, phys. Kochsalzlösungen- und Serum-Chromatogrammen war nichts zu bemerken. Das läßt sich übrigens schon aus der schlechten Adsorbabilität der anorganischen Elemente und Verbindungen schließen. Der quantitative Nachweis eines Elementes in verschiedenen Chromatogrammabschnitten wurde aus technischen Gründen weggelassen.

Bei der Chr. Ad. der verschiedenen Zucker bestand die Schwierigkeit, diese farblosen Körper auf dem Chromatogramm nachzuweisen.

Wir haben zuerst probiert, eine Adsorbtionssäule aus dem Glaszylinder herauszupressen, um nachher ein Zuckerreagens darauf wirken zu lassen. Wir haben auch versucht, das Reagens vor der Chr. Ad. wirken zu lassen, und zwar Pikrinsäure, weil die Metallniederschläge wie Kupfer und Bismuth die Säule garnicht durchdringen. Man erhält dann einen gelben und einen braunen Ring; dieses Bild entsteht aber mit Glucose, Galaktose, Lävulose und Saccharose, ohne den geringsten Unterschied. Das zeigt schon, daß für die Kohlehydrate die Chr. Ad. wenig in Betracht kommt.

Wir haben schließlich noch versucht, den blauen Farbstoff, der durch Einwirkung von Jod auf Stärkekleister entsteht, in seine beiden Komponenten Amylose (blau) und Amylopectin (violett) (26) zu zerlegen. Mit allen gewöhnlichen Adsorbentien bekommt man aber nur einen sehr schmalen blauen Ring.

Wir haben auch Fette chromatographiert, und zwar Olivenöl, Lebertran, Extrakte aus Menschenfett und aus Menschenserum. Als Lösungsmittel nahmen wir Petroläther. Bei all diesen Fetten erhält man außer einer schmalen gelben Zone aus Lipochromen gar nichts.

Wenn man die Fettlösungen mit einem Fettfarbstoff, wie z. B. Soudan färbt, bekommt man oben eine rot-violette, in der Mitte eine rote und unten eine gelbe Zone. Wenn man den in Petroläther gelösten Farbstoff chromatographiert, ist die Farbenverteilung violett, gelb, rot.

Mit den Eiweißkörpern haben wir ebenfalls verschiedene Versuche angestellt. Wir haben das Serum allein, oder gefärbt, z. B. mit Trypanblau, chromatographiert. Wir haben auch Eiweißreagenzien wie Biuret, Xantoprotein, Millon, Diazo nach *Pauly* entweder auf die Adsorbtionssäule nach der Chr. Ad. oder auf das Serum vor der Chr. Ad. einwirken lassen. Wir haben keinerlei Unterschiede bekommen; auch wenn wir getrennte Albumin- oder Globulinlösungen verwendet haben, war das Chromatogramm ganz einfach.

Mit Harn kann man die Pigmente schön isolieren; diese Versuche sind aber schon publiziert worden (12).

Adsorbsionsanalyse und Stuhlextrakte.

Es ist uns bis jetzt nichts bekannt über Stuhluntersuchungen durch die Chr. Ad. Auch in der Literatur haben wir nichts darüber gefunden, bis auf eine kleine Mitteilung aus der Medizinischen Poliklinik in Basel (32). — Wir haben also auch versucht, auf dem Gebiete der Stuhl-Chromatographie interessante Erscheinungen festzustellen.

Als Extraktionsmittel haben wir Äther, Pyridin, Petroläther und Chloroform ausprobiert. Die schönsten Chromatogramme erhielten wir mit Pyridin und Chloroform. Wir haben Chloroform vorgezogen, da Pyridin unerwünschte Farbenprodukte erzeugt, und andererseits, weil es Stickstoffuntersuchungen aus den Stuhlpigmenten fälschen kann. Extrakte mit Alkohol und Eisessig sind nicht indiziert, weil sie sehr schlecht adsorbiert werden.

Für die Chloroformextraktion wurde eine Menge Stuhl von ca. 100 g in einen Mörtel gebracht und mit dem Kolben mit einer kleinen Menge Chloroform gerieben. Als die Flüssigkeit an Farbintensität nicht mehr deutlich zunahm, wurde sie abgegossen und filtriert. Dies wurde ca. 5 Mal wiederholt, bis sich das Extrakt heller zeigte. Die gebrauchte Menge Chloroform war je nach Pigmentmenge des Stuhles verschieden und betrug ungefähr 150 bis 200 cm^3. Das Extrakt wurde dann auf einer Schale bei Zimmertemperatur etwas verdunstet, damit sich die Flüssigkeit konzentrierte. Wir haben versucht, mit dem Soxletapparat zu extrahieren; bei höherer Temperatur werden aber dabei einige Pigmente zerstört.

Als Adsorbens haben wir zuerst wie gewöhnlich Kalk genommen. Die Pyridinextrakte erzeugen oben einen gelbbraunen Ring, der sehr fest adsorbiert ist. Im unteren Teil der Säule findet sich ein gelber Ring, der sehr schlecht adsorbiert ist und sich leicht waschen läßt.

Das Chloroformextrakt auf Kalk ergab etwas Ähnliches. Die Farben waren aber nicht so dunkelgrau wie mit der Pyridinlösung und die Ringe deswegen viel leichter abzugrenzen.

Das Chromatogramm wurde zuerst mit Chloroform gewaschen, dann mit Petroläther weiter entwickelt. Es bildeten sich dabei schönere und schärfere Ringe.

Das Chromatogramm bestand hauptsächlich aus 2 Teilen: einem oberen, dunkelbraunen, gut adsorbierten, wie bei den Pyridinextrakten, und einem unteren, breiteren, leicht auswaschbaren.

Der obere Teil enthielt einige dunkelbraune Ringe, gefolgt von einigen sehr hellen und weniger deutlichen, meist blau, violett, aber auch grünlich oder hellrötlich gefärbten Ringen. Es folgte dann eine farblose Zone, die umso breiter war, je mehr man gewaschen hatte. Der untere Teil bestand aus einem oberen gelbbraunen Ring, der ziemlich breit war. Dann folgte ein schwacher, heller rosaroter und schließlich ein hellgelber Ring.

Der obere Ring besaß immer die gleiche Farbintensität. Wenn man also eine konzentriertere Lösung chromatographierte, bildete sich ein erweiterter Ring. Der untere dagegen hatte je nach Konzentration der Lösung eine wechselnde Intensität. Das ist so zu erklären, daß die unteren Farbstoffe sehr schlecht adsorbiert, auf dem Adsorbens gar nicht zurückgehalten, sondern sofort weggewaschen werden.

Nach den Versuchen mit Kalk haben wir solche mit den anderen Adsorbentien angestellt. Auf Bleicherde sind die Chromatogramme dunkelgrau, die Ringe sind nicht deutlich voneinander getrennt, und das Bild ist ungefähr gleich wie auf Kalk. Auch auf einem Gemisch von Kalk und Calcium-Carbonat bekommt man keine besseren Chromatogramme.

Auf Aluminium-Hydroxyd geben die Stuhlextrakte sehr schöne Bilder, die sich in scharfen Ringen auf dem weißen Grund sehr deutlich abheben. Das Chloroformextrakt wird wie bei den anderen Chromatogrammen wieder in zwei Gruppen geteilt. Jede Gruppe wird aber in verschiedene Ringe zerlegt, sodaß die Chr. Ad. viel vollständiger wird und man reinere Substanzen erhält. Auf der Fig. 3 ist ein Stuhlchromatogramm abgebildet.

Die obere Zone (6) besteht aus einem mehr oder weniger breiten, gelbbraunen Ring, gefolgt von einigen hellen, schmalen Ringen von verschiedenster Farbe (5). (Rosa, gelb, blau, violett, u. s. w.). Alle diese Ringe stehen eng aneinander, sodaß der ganze obere Teil nie sehr breit ist. Bei der Entwicklung läßt sich der Ring auch nicht verschieben oder verbreitern. Der untere Teil enthält im Gegenteil Ringe, die immer ziemlich weit voneinander stehen. Er beginnt mit 1 oder 2 hellgelben Ringen (4), welche immer zusammen bleiben. Es folgt dann ein grüner, ziemlich schmaler (3) und zum Schluß ein breiter, orangefarbiger Ring (2), der unten durch einen schmalen scharfen orangegelben Streifen abgeschlossen ist (1).

Wir haben nun die verschiedenen Ringe mechanisch getrennt und eluiert.

Die unteren Ringe sind mit Äther sehr leicht eluierbar. Die oberen dagegen haben uns Schwierigkeiten geboten. Die Pigmente sind mit organischen, neutralen Flüssigkeiten schwer zu gewinnen. Als wir Kalkchromatogramme herstellten, haben wir das gefärbte Kalkpulver in ein wenig Wasser aufgeschwemmt und dann wurde bis zur kompletten Kalkauflösung Eisessig oder konzentrierte Salzsäure beigefügt. Darauf wurde die gelbe Flüssigkeit mit Chloroform extrahiert. Der größte Teil der Pigmentmenge löste sich dann im Chloroform auf und konnte auf diese Weise untersucht werden. Dabei wurden allerdings einige Pigmente zerstört oder in andere umgewandelt. Aus Aluminiumhydroxyd wurde für den oberen Teil die Elution noch schwieriger, da dieses Adsorbens in Eisessig schwer löslich ist. Eine ganz geringe Menge konnte mit einem Gemisch von Methanol und etwas Äther extrahiert werden. Mit n : 1 Natronlauge bekommt man eine verhältnismäßig gute Elution. Die Extraktion mit Chloroform geschieht aber erst nach genügender Ansäuerung mit Eisessig. Wir haben schließlich mit Eisessig und Methanol zu eluieren versucht, eine Extraktion mit Chloroform ist aber dann sehr schwierig. Keine dieser 3 Elutionsmethoden hat sich als befriedigend erwiesen.

Wir werden jetzt die Ergebnisse unserer Identifizierungsversuche angeben, um mit den Unterschieden abzuschließen, die wir in den verschiedenen Stühlen gefunden haben.

Was die Extrakte aus den obersten Chromatogrammteilen betrifft, so ist folgendes zu sagen:

1. Sie sind in Wasser und Alkohol leicht löslich, ebenso in Chloroform, viel weniger in Pyridin und gar nicht in Äther und Petroläther.
2. Sie ergeben mit dem *Schlesinger*-Reagens eine grüne Fluorescenz, meist ohne Jodzusatz.
3. Sie geben oft eine positive Urobilinogenreaktion.
4. Sie sind stickstoffhaltig.

Das läßt schon vermuten, daß diese Substanzen Bilirubinoide sind. Dies ist auch durch die Spektralanalyse zum Teil nachgewiesen. Man darf wohl sagen, daß diese Substanzen zum großen Teil aus Sterkobilin bezw. Sterkobilinogen bestehen. Es ist uns nämlich gelungen, aus dem Extrakt des oberen gelb-braunen Ringes

Kristalle des Sterkobilinchlorhydrates und seiner $FeCl_3$-Verbindung darzustellen. Die anderen Farbringe sind wahrscheinlich andere Abkömmlinge des Gallenfarbstoffes.

Im unteren Teil des Chromatogramms haben wir folgendes gefunden: Die Substanz aus dem grünen Ring war in Wasser unlöslich, wohl aber in Pyridin, Äther, Aceton, Alkohol, Chloroform, und war sehr leicht zu kristallisieren. Der Schmelzpunkt der Kristalle liegt bei ca. 78 °.

Die Lösung war je nach dem Solvens grün bis gelblich grün und zeigte eine schöne rote Fluoreszenz. Die Spektralanalyse ergab folgendes:

Endabsorbtion	4283
Band	4959—5108
Gleich starkes Band	5310—5425
Sehr schwaches „	5600
Sehr starkes „	6570—6750

Dieses Spektrum, sowie die rote Fluoreszenz, entsprechen einem Abbauprodukt des Chlorophylls. Am meisten stimmt es mit demjenigen des Phaeophytin a überein. Ein ähnliches Spektrum ergibt ein Stuhlextrakt nach Genuß von Spinaten, auch ohne chromatographiert zu werden (33).

Die Identifizierung der anderen Ringe war schwieriger. Die Pigmente sind in Wasser nicht löslich. Sie geben mit dem *Schlesinger*-Reagens keine Fluoreszenz, auch nicht mit Jodzusatz. Kristallisationsversuche in Äther, Alkohol, Pyridin, Aceton und Chloroform blieben erfolglos. Das Pigment der unteren Zone löst sich wenig in Alkohol, wohl aber in Äther und Petroläther wobei die Lösung gelb und in Chloroform und Schwefelkohlenstoff, wobei sie orangegelb gefärbt ist. Es gibt eine positive Reaktion mit Antimontrichlorid nach *Carr* und *Price* (28). Bei der Spektralanalyse in Schwefelkohlenstoff findet man folgendes:

End. Abs.		bis	4118
dann	4432	„	4589
	4715	„	4915
	5037	„	5217

Dieses Spektrum entspricht demjenigen einer Carotinelösung in Schwefelkohlenstoff. Diese Tatsache und die anderen physikalischen Eigenschaften lassen vermuten, daß die untere Zone aus Carotinoiden besteht.

Die mittlere gelbe Zone hat dieselben Löslichkeitsverhältnisse, und, dem Spektrum nach, entspricht sie am meisten den Xantophyllen.

Wir haben schließlich Chromatogramme einiger Stühle in Bezug auf das Gesamtbild untersucht.

Säuglingsstühle ergaben meist nur die obere Zone, also Bilirubinoide. Die Zonen, die den Carotinoiden entsprechen, waren sehr schwach oder meist überhaupt nicht zu sehen.

Bei Stühlen eines Patienten mit leichter Diarrhoe waren die unteren Zonen sehr stark, die oberen dagegen schwach.

Nach einer Kost mit reichlich Spinat oder Tomaten war die grüne, bezw. die orange Zone besonders intensiv vorhanden. Der Stuhl eines Patienten mit Schonungskost zeigte die unteren Ringe ganz schwach, und bei einem Patienten, der lange Zeit hindurch flüssig ernährt wurde, waren die unteren Zonen gar nicht zu sehen.

Da sich viel Stärkobilin im Kot bei perniciosa oder Hämol. Ikterus (29) findet, haben wir Perniciosa-Stühle chromatographiert, jedoch ohne wesentliche Unterschiede zu bekommen.

Schließlich haben wir bei vielen Stühlen mit starker, positiver Benzidinreaktion einen auffallenden Befund erhalten. Bei der obersten Zone des Chromatogramms bildete sich eine rosarote anstatt einer gelb-braunen Färbung. Das wurde ungefähr in 10 Fällen konstatiert. Jedoch haben wir diesen Befund künstlich durch Mischen von Blut mit Stuhl und anschließender Extraktion und Chr. Ad. nicht erzeugen können.

Zusammenfassung.

Wir haben in dieser Arbeit die Möglichkeiten der chromatographischen Adsorptionsanalyse untersucht. Wir haben uns zuerst mit den verschiedenen technischen Fragen beschäftigt und diese sodann zum Teil für unsere Versuche modifiziert.

Anschließend studierten wir den Einfluß einiger Faktoren auf die Chr. Ad.

Als erste biologische Flüssigkeit prüften wir den Blutfarbstoff, der mit Liquoid vorbehandelt wurde. Es hat sich dabei ergeben, daß man mit Hilfe der Chr. Ad. Mensch- und Tierhämoglobin trennen kann. Unterschiede bei der Chr. Ad. gibt es ebenfalls zwischen normalem und mit CO vergiftetem Blute.

Für farblose Flüssigkeiten, wie z. B. Eiweiß-, Zucker- und Fettlösungen, hat sich die Chr. Ad. als weniger geeignet erwiesen.

Interessanter dagegen war die Stuhluntersuchung durch die Chromotographie. Die Stuhlextrakte (am besten Chloroform) zerlegten sich auf Aluminium-Hydroxyd in mehrere gefärbte Ringe, von denen wir einige identifizieren konnten. Wir fanden fast immer einen unteren orangegelben Ring aus Carotinoiden, (einen grünen aus Chlorophyllderivaten (hauptsächlich Phaeophytin a) und zuoberst einen solchen aus Bilirubinoiden (Stercobilin); ferner noch einen Ring, der vermutlich aus Xantophyllen besteht.

Schließlich fanden wir bei Stühlen, die von verschiedenen Patienten stammten, Unterschiede, welche Rückschlüsse auf die Kost und Verdauungsvorgänge ermöglichten.

Ich möchte nicht unterlassen, an dieser Stelle auch Herrn Prof. Gigon für die Überlassung des Materials und für seine Anregungen bestens zu danken. Ebenso Herrn chem. Ing. *Noverraz* für seine Mithilfe bei den chemischen Untersuchungen.

Literatur.

1. A. Winterstein: Fraktionierung und Reindarstellung von Pflanzenstoffen nach dem Prinzip der Chromatographischen Adsorbsionsanalyse in Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, 1933, Bd. 4.
2. E. Lederer: L'adsorbsion Chromatographique et ses applications. Chimie et industrie, Vol. 33, No 5.
3. Tswett: Ber. Deutsch. Botan. Gesellsch., 1906, Bd. 24.
4. Vegezzi: Thèse Fribourg 1916.
5. Kuhn, Winterstein u. Lederer: Ztschr. physiol. Chem. 1931 Bd. 197.
6. Kuhn u. Lederer: 1931, Bd. 200.
7. Kuhn u. Brockmann: B. D., C. G. 1933, Bd. 66.
8. Winterstein u. Stein: Ztschr. physiol. Chem. 1931, Bd. 220.
9. Winterstein u. Schön: Ztschr. physiol. Chem. 1934, Bd. 230.
10. Karrer, Morf u. Schöpp: Helvet. Chem. Act. 1933, Bd. 16.
11. Karrer u. Schöpp: „ „ „ 1934, Bd. 17.
12. Koschara: Ztschr. Physiol. Chemie, 1935, Bd. 232.
13. Koschara: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1934, Bd. 67.
14. Koschara: Ztschr. physiol. Chem. 1934, Bd. 229.
15. Rugli: Helvet. Chem. Act. 1935, Heft III.
16. Coppelsroeder: Kapillaranalyse, 1900.
17. Schönbein: Verhandl. der Naturforschenden Gesellsch. zu Basel, 1861, III. Teil, 2. Heft.
18. Boutaric: Journal de Chim. Phys.. 1935. Bd. 32, No. 9,
19. Kruyt: Physikalische und Kolloid-Chemie, 1926.
20. Barrenschen u. Prinz: Biochem. Ztschr. 1936, Bd. 284.
21. Freundlich, Herb.: Kapillar-Chemie in Handb. der Physik und Techn. Mechanik. Bd. 7.
22. Chem. Zentralblatt 1936, I., S. 602.
23. v. Krüger: Ztschr. vergl. Psychisologie, Bd. 2, 1925.
24. Haurowiz: Hämoglobine des Menschen. Ztschr. Phys. Chem. 1935, Bd. 232.
25. Hirschfeld u. Hittmayer: Handb. der Allg. Hamatologie 1932.
26. Hárry: Physiolog. Chemie, 1932.
27. Zechmeister: Ztschr. physiol. Chem. 35. Bd. 234, 36. Bd. 239.
28. Karrer u. Wehrli: Nova Acta Leopoldina, 1935, Bd. 1, Heft 2/3.
29. H. Fischer u. Halbach: Ztschr. Physiol. Chem. 1936, Bd. 238.
30. Willstaetter u. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse. 1913.
31. Watson: Ztschr. Physiol. Chem. 1935, Bd. 233.
32. Gigon: Helvet. Med. Acta. Bd. 3, Heft 5, 1936.
33. Schum: Spektralanalyse.

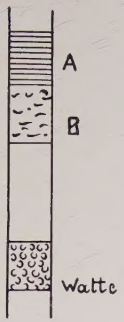


Fig. 1

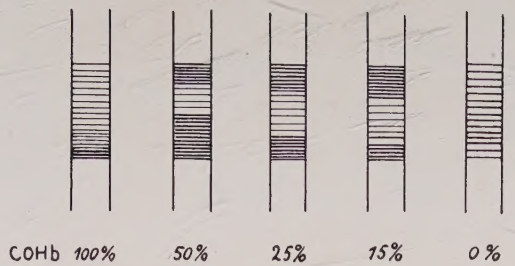


Fig. 2

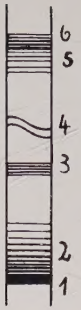


Fig. 3

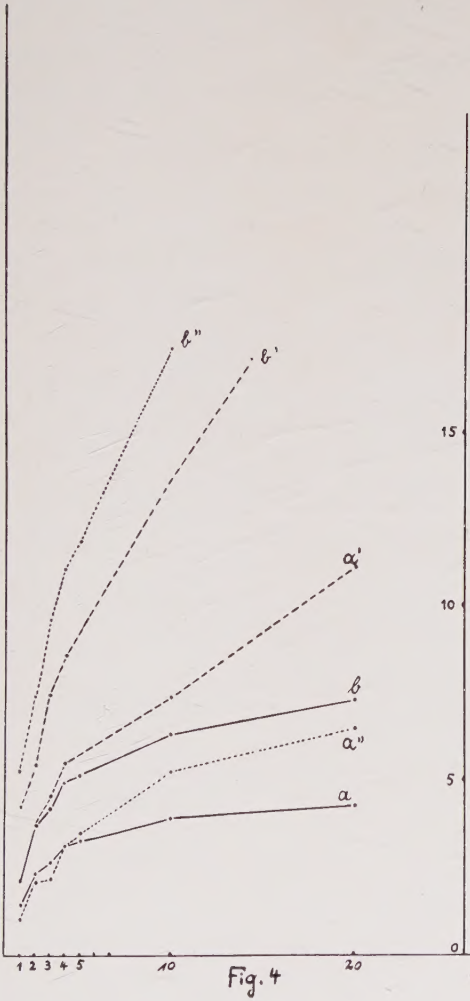
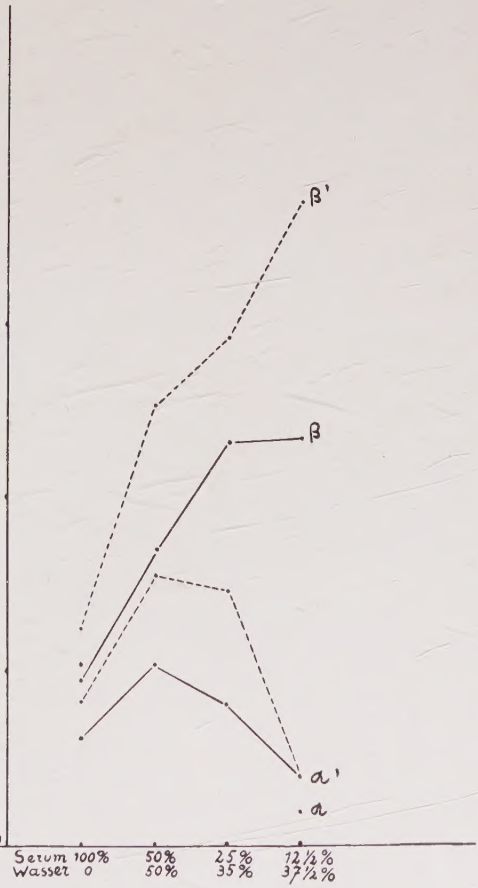
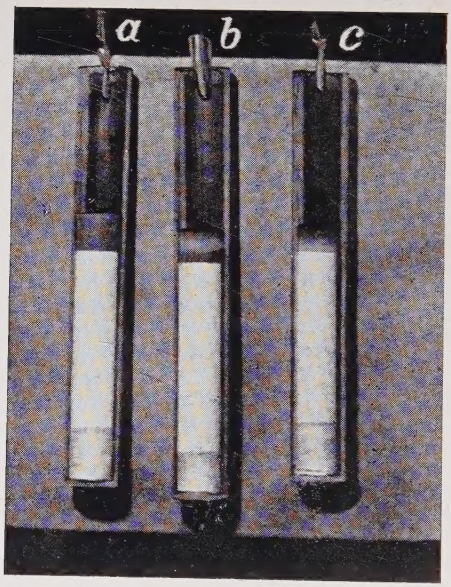


Fig. 4




a
b
c